

文章编号: 1000-2243(1999)S0-0067-02

羟游离基的荧光表征

毛玉霞, 郭祥群

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 提出了 Fenton—荧光探针表征 $\cdot\text{OH}$ 的新方法, 并以吖啶黄为荧光探针研究了此方法的光谱及动力学特征. 在最佳反应条件下, 对多种 $\cdot\text{OH}$ 清除剂的能力进行了表征.

关键词: Fenton 反应; 荧光; 羟游离基

中国图书分类号: O657.32

文献标识码: A

羟游离基是一种源于细胞和组织中的最具活性的生物氧化剂, 极具与蛋白质、脂肪酸及 DNA 作用的活性, 并诱发二级游离基的反应使细胞受到不可逆转的损伤^[1]. $\cdot\text{OH}$ 生物活性的研究在很大程度上决定于 $\cdot\text{OH}$ 的表征技术. 电子自旋共振技术^[2]虽然是测定自由基的好方法, 但其仪器昂贵. 为此, 本文提出一种新的表征 $\cdot\text{OH}$ 的方法.

1 实验方法

在 10.0 mL 容量瓶中加入 0.5 mL 0.1 mol/L 的硫酸, 0.4 mL 0.1 mol/L 的亚铁溶液, 0.2 mL 10^{-4} g/mL 的吖啶黄溶液, 1.5 mL 7.0 $\times 10^{-2}$ mol/L 的 H_2O_2 溶液, 定容 10.0 mL, 摇匀. 室温静置 20 min 后加入 2.0 mL 0.1 mol/L 的 NaAc 溶液, 摇匀, 在 RF-5000 型荧光分光光度计上测量其荧光强度.

2 Fenton—荧光探针表征 $\cdot\text{OH}$ 的机理

为了建立特征 $\cdot\text{OH}$ 表征体系, 本文首先采用体外产生 $\cdot\text{OH}$ 的办法, 即通过化学反应的方式产生 $\cdot\text{OH}$, 并以此为基础对 $\cdot\text{OH}$ 表征体系的反应机制、各种实验参数及表征体系的动力学性质、表征效果进行考察. 为此, 选择了 Fenton 反应作为 $\cdot\text{OH}$ 产生源.

Fenton 反应, 即指二价铁离子(Fe^{2+})与 H_2O_2 在酸性条件下发生作用而产生 $\cdot\text{OH}$ 的反应. $\cdot\text{OH}$ 是极具反应活性的自由基, 当其与某些荧光染料相遇并发生反应时, 将导致荧光强度或其他荧光参数的变化. 如果在体系中加入 $\cdot\text{OH}$ 清除剂, 则可观察到荧光参数的恢复, 由这些荧光参数的变化或恢复, 可跟踪研究 $\cdot\text{OH}$ 的产生、捕捉、及其他动力学行为. 这就构成了本文所提出的 Fenton—荧光探针表征 $\cdot\text{OH}$ 的理论模型:



收稿日期: 1999-06-07

作者简介: 毛玉霞 (1975—), 女, 硕士研究生.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (D9920001)

本文以吖啶黄、罗丹明 B、曙红、荧光素等强荧光物质为荧光探针代表, 以咖啡因、苯多酚及维生素 C 为 $\cdot\text{OH}$ 清除剂代表, 对体系的光谱特征及动力学行为进行了系统的研究.

3 吸收光谱和荧光光谱的研究

从羟基自由基的产生与捕捉对吖啶黄的吸收光谱的影响看, 吖啶黄在稀 H_2SO_4 水溶液中, 有 2 个吸收带, 即 268nm 和 436nm. 在此水溶液中分别加入 Fe^{2+} 或 H_2O_2 , 其吸收光谱几乎不变. 说明 H_2O_2 虽然具有氧化性, 但还不足以氧化吖啶黄. 但当在吖啶黄的稀 H_2SO_4 水溶液中同时加入 Fe^{2+} 和 H_2O_2 , 即构成了 Fenton 反应体系, 吖啶黄的吸收光谱便发生了显著的变化. 2 个吸收带明显减弱, 且减弱的程度与 H_2O_2 的浓度正相关, 说明 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 与吖啶黄发生反应, 导致其吸收结构的破坏. 如果这一设想成立, 那么在体系中加入 $\cdot\text{OH}$ 清除剂, 将对吖啶黄起保护作用, 导致其吸收性质的恢复. 实验结果也正如所预料的一样. 如果在体系中加入天然抗氧剂咖啡因等, 则明显降低 $\cdot\text{OH}$ 对吖啶黄的破坏作用, 吖啶黄的吸收强度回升与抗氧剂的浓度呈良好的线性关系.

吖啶黄是一种强荧光物质, 其荧光的激发、发射波长分别为 453nm 和 510nm. 在吖啶黄稀 H_2SO_4 水溶液中分别加入 Fe^{2+} 或 H_2O_2 , 体系的荧光强度几乎不变, 说明 Fe^{2+} 或 H_2O_2 单独存在对吖啶黄无作用. 但当在吖啶黄的稀 H_2SO_4 水溶液中同时加入 Fe^{2+} 和 H_2O_2 , 可以观察到吖啶黄的荧光强度显著降低. 荧光强度的猝灭与 H_2O_2 的浓度有关, 且在一定的实验条件下满足 Stern—Volmer 方程. 吖啶黄荧光强度的猝灭, 可以认为是由于 $\cdot\text{OH}$ 的产生对吖啶黄的破坏, 导致游离的吖啶黄的浓度降低所致. 如果在体系中加入 $\cdot\text{OH}$ 清除剂咖啡因等, 则可以观察到抗氧剂对吖啶黄荧光保护作用, 荧光强度随着 $\cdot\text{OH}$ 清除剂的浓度的增大而增强. 为排除 Fenton 反应产生的 Fe^{3+} 对吖啶黄的氧化的可能, 本文考察了吖啶黄与 Fe^{3+} 共存时的荧光光谱, 结果表明, 低浓度的 Fe^{3+} 并不足以氧化吖啶黄. 在实际的反应体系中, 由于 H_2O_2 的浓度很低, 产生的 Fe^{3+} 浓度也很低. 因此可以认为吖啶黄的荧光猝灭不是由于 Fe^{3+} 的氧化所致, 而是由 $\cdot\text{OH}$ 的氧化所致. 这就为吖啶黄表征 $\cdot\text{OH}$ 打下了基础.

参考文献:

- [1] Iubec. G The hydroxy radical: from chemistry to human disease [J]. J Investigative Medicine, 1996, 44 (6): 324 ~ 346.
- [2] 张建中, 赵保路, 张清刚. 自旋标记 ESR 波谱的基本理论 and 应用[M]. 北京: 科学技术出版社, 1987.

Probing Hydroxyl Radical by Fluorescence

MAO Yu-xia, GUO Xiang-qun

(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: In this article, we present a new method for probing the generation or scavenging of hydroxyl radical. The method is based on the generation of hydroxyl radical by Fenton reaction and the determination of hydroxyl radical by fluorescence. The spectral and dynamic characteristics of the probing system were investigated.

Keywords: fenton reaction; fluorescence; hydroxyl radical